

北海道医療大学学術リポジトリ

全ゲノム増幅法を用いたA型インフルエンザウイルスの分子疫学

著者	井上 恵美
学位名	博士（薬学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成25年度
学位授与番号	30110乙第103号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00006639/

論文要旨

全ゲノム増幅法を用いた A 型インフルエンザウイルスの分子疫学

平成 25 年度

井上 恵美

【緒言】A型インフルエンザウイルスは、ヒトを始めブタなどの家畜、野生動物、家禽を含む多くの種類の鳥類に分布している。A型ウイルスは8分節のマイナス鎖RNAをゲノムとし、第4及び第6分節がコードするヘマグルチニン(HA)及びノイラミニダーゼ(NA)糖タンパク質の抗原性によって、各々16及び9の亜型に分けられる。鳥類の間では全ての亜型のウイルスが循環しており、全てのA型ウイルスの起源は野生水禽の腸内ウイルスにあると考えられている。

2009年、ブタ、ヒト及び鳥ウイルスの遺伝子再集合体である新型H1N1インフルエンザウイルス[A(H1N1)pdm09]がヒトの間に出現し、21世紀最初のパンデミックが発生した。一方、1997年香港においてH5N1高病原性鳥インフルエンザ(H5N1-HPAI)ウイルスが家禽の間で流行し、ヒトへの感染も確認された。2003年以降、東南アジアやエジプトを中心にH5N1-HPAIの感染者は増え続け、これまでに350名以上の死者を数えている。また、2013年にはH7N9鳥インフルエンザウイルスが中国と台湾の135名に感染し、44名の死亡が報告されている。これらの鳥ウイルスによるヒト-ヒト感染はほとんど認められていないが、一度、ヒトの間での伝播力を獲得すると未曾有のパンデミックを引き起こすこととなる。新型インフルエンザウイルスの出現機構が明らかになるにつれ、鳥類インフルエンザに対する監視が重要視されるようになった。しかしながら、HA及びNAの亜型の同定には多数の特異抗血清が、あるいは遺伝子解析にはその増幅のために多数のプライマーが必要であり、鳥類インフルエンザの疫学調査は一部の研究機関で実施されるのみであった。

本研究では、A型インフルエンザウイルスゲノム分節の両端に保存される共通配列を利用した単一のプライマー対による全ゲノム増幅法を開発し、未知のウイルスにも対応可能な亜型判別法を確立した。次いで、これらの方法を用いて北海道に飛来した野生水禽におけるインフルエンザの分子疫学を実施した。さらに、本学におけるA(H1N1)pdm09の流行状況を解析し、調査で得られた抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの性状を明らかにした。

【方法】A型インフルエンザウイルスのゲノムRNA分節両端の共通配列に相補的な配列に、複数の制限酵素認識配列を含む21塩基を付加したプライマーFWUni12及びRVUni13を設計した。様々な亜型のインフルエンザウイルスからRNAを抽出し、両プライマーを用いたRT-PCRに供して全8分節の全長を増幅した。FWUni12/RVUni13を用いて増幅産物の塩基配列を決定し、Blast解析によってHA及びNA亜型を判別した。また、本ゲノム増幅法を用いて、2007-2012年に北海道各地で採取した渡り鳥の糞便から分離したインフルエンザウイルスの亜型を判別した。さらに、本学におけるA(H1N1)pdm09の流行状況を明らかにするため、本学クリニックで分離されたウイルス70株を全ゲノム増幅法に供した。

増幅された HA 及び NA 遺伝子の塩基配列を決定し、系統進化解析を行った。分離株のオセルタミビルに対する感受性を調べ、低感受性を示したウイルス株についてはブランク純化を行った。得られたクローンの遺伝子性状、増殖性、薬剤感受性について調べた。

【結果・考察】1. A 型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法の開発：様々な亜型のインフルエンザウイルス RNA を単一プライマー対 FWUni12/RVUni13 を用いた RT-PCR に供し、6 断片の増幅産物を得た。最も大きな断片を除く 5 断片の塩基配列を決定したところ、A 型インフルエンザウイルスの HA、核タンパク質、NA、マトリックスタンパク質及び非構造タンパク質遺伝子とよく一致していた。最も大きな断片をプラスミドに挿入して塩基配列を決定したところ、ポリメラーゼ(PB1, PB2 及び PA)遺伝子の配列が得られた。したがって、単一のプライマー対によって様々な亜型ウイルスの全ゲノムを増幅できることが分かった。さらに、HA 及び NA 遺伝子に相当する断片の塩基配列から亜型の判別にも成功した。本法は共通配列に相補的な配列のみを用いていることから、未知の亜型ウイルスにも応用が可能である。

2. 鳥インフルエンザウイルスの分子疫学：道内各地で採取したカモ及びハクチョウの糞便計 1,872 検体から 36 株の赤血球凝集因子が分離された。RNA を抽出して全ゲノム増幅法に供したところ、34 株で DNA 断片が増幅された。各々 HA 及び NA 遺伝子に相当する断片の塩基配列を決定したところ、HA で 10 種類、NA で 7 種類の亜型遺伝子が認められた。北海道に飛来する渡りガモが様々な亜型の A 型インフルエンザウイルスに感染していることが確認された。

3. 本学における A(H1N1)pdm09 の分子疫学：2009 年 9 月-12 月に本学クリニックで分離されたウイルス 70 株は、全て A(H1N1)pdm09 であった。HA 及び NA 遺伝子の系統進化解析を行ったところ、HA 遺伝子は 3 グループ、NA 遺伝子は 2 グループに分けられた。2 度の学年閉鎖では、異なるグループのウイルスが流行していたことが分かった。これらのオセルタミビルに対する感受性を調べたところ、2 株(T29, T64)が低感受性を示した。T29 の NA はオセルタミビル耐性に関与するアミノ酸変異(S247N)を有しており、低感受性はこの変異によるものと考えられた。また、T29 のブランク純化株 2 クローンは NA の軸領域に 11 アミノ酸の欠損を有していた。インフルエンザウイルスの病原性には HA と NA 活性のバランスが重要と考えられている。今後、T29 のアミノ酸欠損株について病原性を調べる必要がある。一方、T64 の純化株では NA の酵素活性部位を完全に欠失する株が検出された。本クローンは NA 活性を欠くにも関わらず野生株と同等以上の細胞間伝播能を示した。さらに、細菌由来シアリダーゼによってウイルス粒子の放出が増強された。このような NA 欠損株はいかなる NA 阻害剤も無効であり、細菌との混合感染によって高い病原性を示す危険がある。

【結論】わずか 1 組のプライマー対を用いて A 型インフルエンザウイルスの全ゲノムを増幅し、未知の A 型ウイルスにも応用可能な亜型の判別方法を開発した。本法を用いて鳥類インフルエンザの疫学調査を実施するとともに本学における A (H1N1) pdm09 の流行状況を解析した。その結果、新規メカニズムによる薬剤耐性株の検出にも成功した。簡便な全ゲノム増幅法及び亜型判別法の開発はインフルエンザウイルスの疫学調査のみならず、ワクチン開発、ウイルス遺伝子の機能解析に極めて有用である。